

DIE AUSSCHIEDUNG VON VERESTERTEN
17-21-DIHYDROXY-20-KETOSTEROIDEN IM HARN
NACH VERABREICHUNG VON PROGESTERON

Iradj Mahdavian

1964





Digitized by the Internet Archive
in 2026



https://archive.org/details/IA41548301_0083

AUS DER 1. FRAUENKLINIK UND HEBAMMENSCHULE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. Bickenbach

DIE AUSSCHIEDUNG VON VERESTERTEN
17-21-DIHYDROXY-20-KETOSTEROIDEN IM HARN
NACH VERABREICHUNG VON PROGESTERON

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Iradj Mahdavian
aus Iran (Persien)

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Do. Dr. R. KAISER
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. BICKENBACH
Dekan:	Professor Dr. R. BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 17.3.1964

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSÜBERSICHT

- A. Einleitung
- B. Allgemeiner Teil
 - 1. Chemie, Synthese, Stoffwechsel und zentrale Wirkung der Corticosteroide.
 - 2. Der Stoffwechsel des Progesterons.
- C. Methodischer Teil
 - 1. Bestimmungsmethoden für Corticosteroide.
 - 2. Angewandte Methode.
- D. Spezieller Teil
 - 1. Die Wirkung von Progesteron auf die Ausscheidung der Corticosteroide.
 - 2. Eigene Ergebnisse.
 - 3. Besprechung der Ergebnisse.
 - 4. Diskussion.
 - 5. Zusammenfassung.
 - 6. Literaturverzeichnis.

E I N L E I T U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausscheidung von veresterten cortisonartigen Porter - Silber - Chromogenen im Urin nach Verabreichung von Progesteron untersucht. Veranlassung für diese Arbeit waren neuere Versuchsergebnisse mit radioaktiv markierten Progesteron, wonach dieses durch die Nebenniere (NN) in Corticosteroide umgewandelt wird. Bisher liegen aber keine Beweise dafür vor, daß diese Umwandlung auch eine Veränderung der Corticoidausscheidung zur Folge hat. Infolgedessen schien es von Interesse, dieser Frage nachzugehen.

Da Gestage eine immer größere therapeutische Bedeutung gewinnen, ist es notwendig, ihre Rückwirkungen auf das hormonale Regulationssystem des Organismus und die Möglichkeiten ihrer Beeinflussung von anderen Inkretdrüsen zu kennen.

Die Interpretation der Ergebnisse und eine kritische Stellungnahme erfordern die Kenntnis der mit diesen Fragen zusammenhängenden endokrinologischen Grundlagen, die deshalb am Anfang dieser Arbeit zusammengestellt wurden.

ALLGEMEINER TEIL

1. NEBENNIERENRINDEN - HORMONE

Die Nebennierenrinde (NNR), deren lebenswichtige Bedeutung ADDISON und BROWNE-SEQUART 1955/56 erkannten, produziert über 40 Steroide. 7 dieser Verbindungen zeigen im Tierversuch die für NNR - Extrakte kennzeichnenden Wirkungen.

Da die eine Gruppe dieser Hormone mehr auf den Kohlenhydrat - Eiweiß - Stoffwechsel, die andere mehr auf den Mineralstoffwechsel wirkt, ist eine Einteilung in Gluko - und Mineralo - Corticoide (Corticoide sind NNR - Hormone und ihre Metaboliten) möglich geworden.

Beide Hormongruppen unterscheiden sich auch in ihrer chemischen Struktur: Die Gluko - Corticoide tragen an C₁₁ eine freie Alkohol - oder Ketogruppe, die Mineralo - Corticoide nicht.

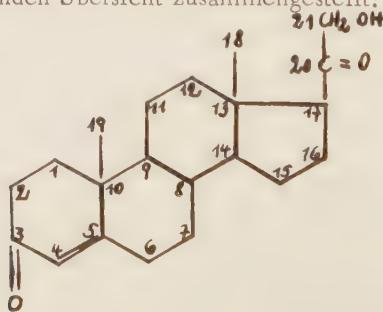
Dieser dualistischen Auffassung steht die unitaristische Auffassung VERZARS (27) gegenüber. VERZAR vermutet, daß alle Hormone primär auf den Kohlenhydrat - Energie - Haushalt wirken und die Mineralstoffwechselwirkung sekundär als Folge energetischer Veränderungen entsteht.

In der Tat überschneiden sich die physiologischen Wirkungen der einzelnen Hormone (23, 16). Bis zur Entdeckung des Aldosterons war kein Hormon bekannt, das eine hohe spezifische Wirkung auf den Mineralstoffwechsel hatte. Die Entdeckung des Aldosterons und seiner äußerst aktiven Wirkung auf den Mineralstoffwechsel scheint aber die Einteilung in Gluko - und Mineralo - Corticoide zu rechtfertigen (29).

Die sieben eigentlichen NNR - Hormone sind Derivate **L**4 - Pregnens. Diese Verbindung besitzt 21 Kohlenstoffatome, die einen Steranring mit einer zweiatomigen Seitenkette an C₁₇ bilden. Zwischen den Kohlenstoffatomen in Stellung 4 und 5 liegt eine Doppelbindung.

Die einzelnen aktiven Hormone unterscheiden sich in der Substitution des **L**4 - Pregnens. Allen gemeinsam ist eine Ketogruppe an C₃ und C₂₀ sowie eine Alkoholgruppe an C₂₁. Die Substitution der übrigen Wasserstoffatome wechselt.

Die Anordnung der Substituenten und die Namen der einzelnen Hormone sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt:



Mineralo-Corticoide.

Bezeichnung des Hormons	Substituent in Stellung		
	11	17	18
11-Desoxy-corticosteron	-	-	-
⌞ 4-Pregnen-3, 20-dion-21-ol			
Reichstein Q			
Cortexon			
11-Desoxy-17-hydroxy-corticosteron	-	OH	-
⌞ 4-Pregnen-3, 20-dion-17, 21-diol			
Reichstein S			
Aldesteron	(OH	-	OH)
Elektrocortin			
(Die Aldehydgruppe an C ₁₈ bildet mit der Alkoholgruppe in Stellung 11 ein cyclisches Halbacetal)			

Gluko-Corticoide.

Bezeichnung des Hormons	Substituent in Stellung	
	11	17
Corticosteron	OH	-
⌞ 4-Pregnen-3, 20-dion-11-diol		
Kendall B		
Reichstein H		
11-Dehydro-corticosteron	0	-
⌞ 4-Pregnen-3, 11, 20-trion-21-ol		
Kendall A		
17-Hydroxy-corticosteron	OH	OH
⌞ 4-Pregnen-3, 20-dion-11, 17, 21-triol		
Kendall F		
Reichstein M		
Cortisol		
17-Hydroxy-11-dehydro-corticosteron	0	OH
⌞ 4-Pregnen-3, 11, 20-trion-17, 21-diol		
Kendall E		
Reichstein Fa		
Wintersteiner F		
Cortison		

Wie PINCUS und Mitarb. (8) im Durchströmungsversuch an isolierten NN zeigen konnten, werden Cholesterin und 5-Pregnenolon in Steroidhormone umgewandelt. Diese Substanzen können daher als Ausgangsprodukte für die Biosynthese der Steroidhormone angesehen werden.

BLOCH (2) wies schon 1945 nach, daß Cholesterin in Pregnandiol, ein Reduktionsprodukt des Progesterons, umgewandelt wird. Nach oraler Gabe von markiertem Cholesterin konnte er aus dem Urin einer Schwangeren markiertes Pregnandiol isolieren. Dieser Befund wurde von PLOTZ (20) bestätigt.

Progesteron kann aufgrund der Durchströmungsversuche von PINCUS (13) direkt aus 5-Pregnenolon entstehen. Es entspricht in seiner chemischen Struktur einem 11-Desoxy-corticosteron ohne Alkoholgruppe an C₂₁.

Nach ZANDER (32) ist die Annahme begründet, daß Progesteron in den steroidbildenden Drüsen aus Acetat und Cholesterin entsteht.

Daher kann folgender Weg für die Synthese angenommen werden (26):
Acetat-Cholesterin- 5-Pregnenolon-Progesteron

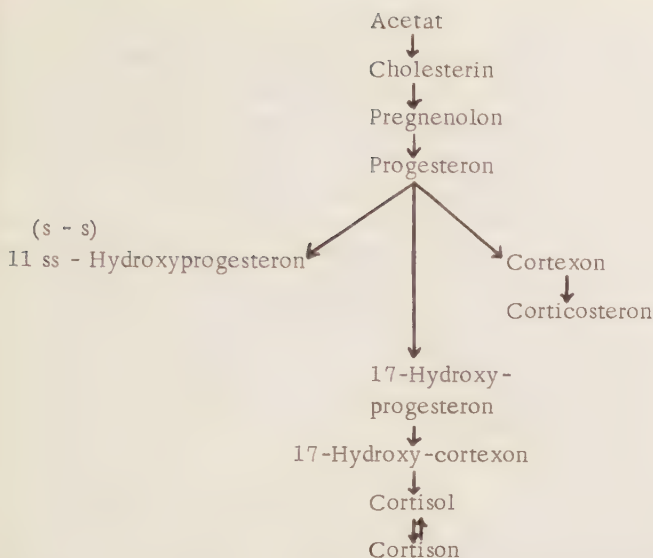
Allerdings ist noch nicht ganz klar, ob die Biosynthese grundsätzlich über Cholesterin als Zwischenprodukt verläuft (32).

PINCUS und Mitarb. (8, 13) gelang im Durchströmungsversuch an isolierten NN der Nachweis, daß Progesteron und 5-Pregnenolon in höher hydroxylierte Steroide umgewandelt werden. Sie erhielten 11-Hydroxy-progesteron, Corticosteron und 17-Hydroxycorticosteron. Es erfolgte also eine Hydroxylierung an den Kohlenstoffatomen 11, 17 und 21.

Diese Hydroxylierung konnte auch in vivo am Menschen bewiesen werden. Nach Injektion von C¹⁴-4-Progesteron (Progesteron mit radioaktivem Kohlenstoff in Stellung 4 des Ringgerüsts) fand PLOTZ (20) bei einer Frau in der Schwangerschaft und bei einer Frau mit Mb. Cushing radioaktives Cortisol und Cortison im Urin. Allerdings handelt es sich in diesem Fall nur um einen qualitativen Nachweis dieses Umbaues, so daß über das Ausmaß der Reaktion keine Angaben gemacht werden können.

Versuche von PINCUS (13) sowie von SAMUELS (20) führten zu dem Ergebnis, daß die Hydroxylierung nur in der Reihenfolge 17, 21, 11 möglich ist. WETTSTEIN (28) teilte allerdings mit, daß diese strenge Auffassung heute nicht mehr haltbar sei, doch verlaufen die hauptsächlichsten normalen Reaktionen in dieser Reihenfolge.

Cortisol kann, wie COPE und Mitarb. (4) mitteilen, in Cortison umgebaut werden; zwischen beiden Verbindungen entsteht ein dynamisches Gleichgewicht. Daher wird angenommen, daß die Synthese nach folgendem Schema abläuft (modifiziert nach SAMUELS):

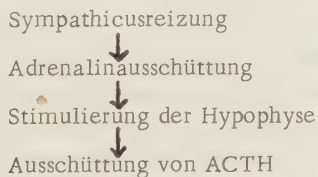


Progesteron nimmt demnach eine zentrale Stellung in der Synthese der NNR - Hormone ein, es wurde deshalb von DORFMAN (5) als "basic compound" bezeichnet.

Die Produktion der NNR - Hormone unterliegt der Regulation durch den Hypophysenvorderlappen (HVL). Dieser scheidet ACTH (adrenocorticotropes Hormon) aus, das die Voraussetzung für eine permanente Hormonproduktion und Erhaltung der Struktur des NNR ist (17). ACTH stimuliert besonders die Produktion von Gluko-Corticoiden (23).

Die NNR - Hormone bewirken rückläufig eine Hemmung der ACTH-Produktion. Der Grad der Hemmung ist, wie SAYERS und Mitarb. (22) durch Injektionsversuche zeigen konnten, der injizierten Menge von NNR - Hormonen proportional. Diese humorale Selbstregulation verläuft langsam (14).

Der humoralen Selbstregulation ist die schnell verlaufende neuro - humorale Regulation übergeordnet. LONG (14) nimmt folgenden Weg an:



Diese Regulation scheint im Stress wirksam zu sein. Stress ist nach SELYE (23)

eine Alarmreaktion des Organismus auf die verschiedenen Belastungen.

PINCUS (8) konnte nachweisen, daß ACTH im Durchströmungsversuch die Hydroxylierung der Steroid-Vorstufen nicht verstärkt, man muß daher annehmen, daß sein Einfluß auf die Synthese vor der Bildung von Progesteron liegt.

PINCUS (8) vermutet, daß ACTH den Abbruch der Seitenkette des Cholesterins und damit dessen Umwandlung in C_{21} - Steroide katalysiert.

Der überwiegende Teil der Glukocorticoide wird vor der Ausscheidung inaktiviert. Die wichtigsten hierbei entstehenden Metaboliten sind in folgender Tabelle zusammengestellt (in Anlehnung an WETTSTEIN (28):

1. 5 - Konfiguration und 3 - Hydroxyl
(Tetrahydro - Verbindungen)
2. 5 - Konfiguration und 3 - Hydroxyl
(Allotetrahydro - Verbindungen)
3. 20 - hydroxylierte Verbindungen
(Cortol und Cortolon)
4. Steroide mit 19 Kohlenstoffatomen.

Die Tetrahydro - Verbindungen entstehen durch Reduktion der Doppelbindung zwischen C_4 und C_5 sowie durch Reduktion der Ketogruppe an C_3 , ihre Stereoisomere sind die Allotetrahydro - Verbindungen.

Cortol und Cortolon entsprechen Tetrahydro - Verbindungen, deren Ketogruppe an C_{20} zu einer Alkoholgruppe reduziert ist.

Durch Abbau der Seitenkette an C_{17} entstehen aus den NNR - Hormonen Verbindungen mit 19 Kohlenstoffatomen. Tragen sie an C_{17} eine Ketogruppe, so werden sie als 17 - Ketosteroide bezeichnet.

Die Ausscheidung der Gluko - Corticoide und ihrer Metaboliten erfolgt zum weitaus größten Teil im Urin. HELLMANN und Mitarb. (7) fanden nach Injektion von radioaktiv markiertem Cortisol 70 - 80% der Radioaktivität im Urin der nächsten 24 Stunden, nur 9% wurden im Stuhl der folgenden 4 Tage ausgeschieden. Die Werte von COPE und Mitarb. (4) liegen sogar noch höher. 86% der injizierten Cortisol - Radioaktivität und 70% der Radioaktivität des injizierten Cortisons wurden im Urin der folgenden 24 Stunden gefunden.

ZANDER (31) berichtet über eine Ausscheidung der NNR - Hormone durch die Haut bei starker Schweißabsonderung.

Im Urin werden hauptsächlich Metaboliten der Gluko - Corticoide ausgeschieden. Man findet aber auch die aktiven Hormone selbst, allerdings nur in geringer Menge.

Zum überwiegenden Teil erfolgt die Ausscheidung der Metaboliten in gebundener Form. Tetrahydro - Verbindungen werden fast in ihrer Gesamtheit durch die Leber in 3 - Stellung an Glukuronsäure gebunden (28), nur ein sehr geringer Teil

scheint frei ausgeschieden zu werden.

Die Bindung der aktiven Hormone an Glukuronsäure kann nur in Stellung 21, 17 oder 11 erfolgen. C_{21} - und C_{17} -Glukuronide sind sehr leicht spaltbar, daher ist höchstens mit einer Ausscheidung von C_{11} -Glukuroniden zu rechnen (25). Cortison trägt aber an C_{11} eine Ketogruppe, eine glykosidische Bindung ist daher an dieser Stelle nicht möglich. Zudem fanden COPE und Mitarb. (4), daß Cortisol und Cortison die wichtigsten Bestandteile der nach Ansäuerung auf pH 1 chloroformlöslichen Fraktion sind.

Da nach SCHNEIDER (24) die Ausbeute an Cortisol und Cortison durch Hydrolyse bei pH 1 nur gering ansteigt (Cortison um ca. 16%), ist anzunehmen, daß Cortisol und Cortison zum größten Teil frei ausgeschieden werden.

In der folgenden Tabelle sind die in 24 Stunden ausgeschiedenen Mengen der einzelnen Hormone und ihre Metaboliten angegeben:

Die Corticoide Ausscheidung in 24^h Urin.

	Burton (5)	Bush (6)	Romanoff (27)	Wettstein (37)
Cortison	15-40 ♂			
Cortisol	15-40 ♂			
Tetrahydrocortison		3,4 mg	3,1 mg	bis 5 mg
Tetrahydrocortisol		2,0 mg	1,3 mg	bis 3 mg

	Burton (5)	Bush (6)	Romanoff (27)	Wettstein (37)
Allotetrahydrocortison		Spuren		
Allotetrahydrocortisol		0,8mg	1,3 mg	1-2 mg
Cortol und Cortolon				ca. 3 mg

Die 17 - Ketosteroide stammen nur zum Teil aus dem Corticoidstoffwechsel. Nach LABHART (16) werden höchstens 10 bzw. 15% Cortison und Cortisol in 17 - Ketosteroide umgebaut.

Cortison und Cortisol sowie ihre Tetrahydro - Verbindungen erscheinen im Urin zu etwa gleichen Teilen in freier Form (3). Nach Angaben von COPE und Mitarb. (4) machen die Tetrahydro - Verbindungen etwa 30% der bei pH 1 extra-hierbaren Corticoide aus.

Nach Injektion von Cortison steigen freie und gebundene Corticoide im Urin an (3), der Anstieg der freien Corticoide ist aber im Verhältnis höher als der der gebundenen (3).

Veränderungen der Konzentration von Cortisol und Cortison im Organismus lassen sich daher durch Untersuchungen der freien und gebundenen 17 - Hydroxycorticoide im Urin gut verfolgen.

2. DER STOFFWECHSEL DES PROGESTERONS

Injiziertes Progesteron ist nur kurze Zeit im Blut nachweisbar; sehr bald wird es im Fettgewebe abgelagert (12). Einige Stunden nach intramuskulärer Injektion beträgt diese Deponierung bis zu 40% (19).

Im Blut wird Progesteron vermutlich unverändert transportiert, so daß es in aktiver Form in die verschiedenen Organe gelangen kann (32).

Progesteron scheint im Wesentlichen zu Pregnandiol abgebaut zu werden. KAISER (9, 10) fand nach Progesteroninjektion innerhalb von fünf Tagen 10-20% der injizierten Progesteronmenge als Pregnandiol im Urin. WIEST (30) konnte nach Injektion von C^{14} - 4 - Progesteron bei einer Frau mit Gallenfistel innerhalb 12 Stunden 40% der injizierten Gesamtradioaktivität in der Galle nachweisen. Das Ausscheidungsprodukt war zum größten Teil Pregnandiol - Glukuronid. Pregnandiol ist ein Reduktionsprodukt des Progesterons. Es entsteht aus dem Progesteron durch Umwandlung der Ketogruppen an C_3 und C_{20} in Alkoholgruppen und reduktive Auslösung der Doppelbindung zwischen C_4 und C_5 .

Allerdings machen es Untersuchungen von BARRY und Mitarb. (1) wahrscheinlich, daß auch ein Teil des Progesterons durch Seitenkettenabbau inaktiviert wird.

Es ist also anzunehmen, daß der NNR nur ein Teil des injizierten Progesterons angeboten wird.

Wie schon erwähnt, entstehen durch Umbau des Progesterons in der NN cortisonartige Substanzen (8, 13, 18, 20); quantitative Blutuntersuchungen liegen bisher nicht vor, so daß keine direkten Angaben über das Ausmaß dieses Umbaues gemacht werden können. Über die Harnuntersuchungen wird im speziellen Teil berichtet.

1. BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR NNR - HORMONE

Zur quantitativen Bestimmung von Corticoiden stehen biologische und chemische Methoden zur Verfügung.

Die meisten biologischen Methoden weisen die spezifischen Hormonwirkungen im Tierversuch nach und haben den Vorteil, daß sie für die Identität der untersuchten Substanzen mit den aktiven Hormonen garantieren. Ihr Nachteil liegt in der relativ großen Fehlerbreite.

Die chemischen Methoden beruhen auf Extraktion der Hormone aus dem Urin, Reinigung des Extraktes und Nachweis einer der einzelnen Hormone kennzeichnenden chemischen Gruppe.

Da solche Gruppen meistens mehreren Hormonen gemeinsam sind, kann keine absolute Spezifität erwartet werden.

Für die Corticoide ist die Ketol - Seitenkette charakteristisch, sie wird mit folgenden Reaktionen erfaßt (34):

1. Formaldehyd - Abspaltung.
2. Reduktionsverfahren.
3. 17 - Ketosteroid - Bildung bei milder Oxydation.
4. Phenylhydrazon - Bildung.

Der Nachweis durch Formaldehyd - Abspaltung und Reduktionsverfahren ist wenig spezifisch; außer Corticoiden können auch andere Substanzen erfaßt werden. Zudem reagieren außer den 17 - Hydroxycorticoiden auch Corticoide ohne Hydroxylgruppe an C₁₇. Weitgehend spezifisch für die 17 - Hydroxycorticoide sind die Phenylhydrazon - Bildung und die 17 - Ketosteroid - Bildung bei milder Oxydation. Das letztgenannte Verfahren erfaßt aber außer den freien auch die gebundenen Corticoide.

Die Extraktion erfolgt mit organischen Lösungsmitteln. Sie kann mit oder ohne vorherige Hydrolyse des Urins vorgenommen werden. Bei der hohen Empfindlichkeit der Corticoide verbietet sich aber eine zu starke Hydrolyse (34).

Wichtig ist die vollständige Erfassung einer Hormongruppe bei der Extraktion, sie ist vom Lösungsmittel abhängig. Corticoide werden mit Chloroform bei dreimaliger Extraktion zu 100% erfaßt, soweit sie in freier Form vorliegen (34). Um eine Erfassung der an Glukuronsäure gebundenen Corticoide zu erreichen, ist die Extraktion mit Butanol nötig.

Bei der Extraktion besteht die Möglichkeit, Mineralo - und Gluko - Corticoide zu trennen. Dies wird durch die Verteilung zwischen einer angesäuerten wäßrigen Phase und Petroläther erreicht (15). Der Nachteil dieser Methode liegt in ihrer großen Anfälligkeit gegenüber den verschiedensten Störungen, zur Erzie-

lung zuverlässiger Ergebnisse ist daher eine lange Einarbeitungszeit nötig.

Mit Hilfe chromatographischer Verfahren ist es möglich, die Steroidhormone einzeln nachzuweisen. Diese Methoden sind aber zeitraubend und verhältnismäßig kompliziert, so daß sich für die Belange der Klinik die einfacheren Gruppenreaktionen durchgesetzt haben.

2. ANGEWANDTE METHODE

Zum quantitativen Nachweis der veresterten Corticoide nach Bebrütung mit β -Glucuronidase wurde die von PORTER und SILBER (21) angegebene Methode verwendet. Sie beruht auf einer Farbentwicklung nach Zusatz von Phenylhydrazin - Schwefelsäure mit Messung der Farbdichte im Photometer. Bei Anwesenheit von 17 - 21 - Dihydroxy - 20 - Ketosteroiden entwickelt sich nach Zusatz von Phenylhydrazin - Schwefelsäure eine gelbe Farbe (21). Die für diese Reaktion wichtige Dihydroxyaceton - Gruppierung besitzt außer Cortison und Cortisol sowie ihren Tetrahydro - und Allotetrahydro - Verbindungen nur noch ein Corticoid, das 17 - Hydroxy - 11 - desoxycorticosteron. Diese Substanz, ein Mineralocorticoid, ergibt also ebenfalls eine Farbentwicklung mit Phenylhydrazin - Schwefelsäure (21). BURTON und Mitarb. (3) konnten in der Fraktion der $C_{21}O_4$ - Corticoide nach Extraktion bei pH 1 drei Δ^4 - Ketole im Urin nachweisen. Es ist denkbar, daß eine dieser Substanzen das 17 - Hydroxy - 11 - desoxycorticosteron ist. Seine Exkretionsrate beträgt höchstens 40% in 24 Stunden. Dieses Mineralocorticoid wird möglicherweise bei der Farbreaktion nach PORTER und SILBER miterfaßt (21).

Im Wesentlichen werden mit dem Verfahren Cortison, Cortisol und ihre Tetrahydro - und Allotetrahydro - Verbindungen, soweit sie in veresteter Form vorliegen erfaßt. Die Normalwerte der Ausscheidung der veresterten Porter - Silber - Chromogene im Urin liegen zwischen 3,4 - 11,1 mg in 24 Stunden KARL (11).

Die Bestimmung der Porter - Silber - Chromogene im Urin wird durch viele Chemotherapeutica gestört. Daher müssen vor Beginn der Versuche alle Medikamente abgesetzt werden.

Da für die Versuche nur Frauen mit weitgehend erloschener Ovarialfunktion und voll funktionstüchtiger NNR in Frage kamen, wurden Patientinnen nach der Menopause und nach Ovariectomie bzw. Röntgenkasteration ausgewählt. Sie befanden sich zur Zeit der Versuche in gutem Allgemeinzustand und erhielten weder Medikamente noch Bestrahlungen. Stress - Situationen wurde also weitgehend ausgeschaltet. Die Verarbeitung des 24 - Stunden Urins erfolgte jeweils sofort; vor der Verabreichung der zu prüfenden Substanz wurden 2 - 3 Ausgangswerte bestimmt.

Arbeitsvorschrift:

Die hier angewandte Methode zur Bestimmung der veresterten 17 - 21 - Dihydroxy - 20 - ketosteroide im Harn nach ZIMMERMANN (35) hat folgende Arbeitsgänge;

- 1) 3 ml des frischen 24 Stunden Urin ganz kurz aufkochen.
Zugabe von:
 - a) 0,3 ml Pufferlösung I =
(27 g CH_3COONa auf 1000 ml mit H_2O)
 - b) 0,3 ml Pufferlösung II =
(200 ml 1_n CH_3COOH auf 1000 ml mit H_2O)
- 3) Einstellung einer Wasserstoff - Ionen - Konzentration von 4,5 (ph) mit 50% Essigsäure.
- 4) Bebrütung mit - Glucuronidase - Schering (1000 Fishman' sche Einheiten pro ml Urin = 3000 E gelöst in 0,3 ml H_2O) 15 Stunden bei 47°C.
- 5) Extraktion:
 - a) Man nimmt einen 50 cm Scheidetrichter, schichtet 22 ml frisch destilliertes Chloroform darauf und schüttelt 2 Minuten kräftig. Nach der Phasen - Trennung wird das Chloroform in einen neuen Scheidetrichter abgelassen.
 - b) Zum Chloroformextrakt gibt man 2 ml 0,1_n NaOH zu und schüttelt 10 Sekunden. Nach der Trennung der Phasen wird das Chloroform filtriert und halbiert (A Blindwert und B Vollwert).
- A: 10 ml Chloroformextrakt kommen in 3 ml der folgenden Lösung: 50 ml absoluter Äthylalkohol + 100 ml verdünnte H_2SO_4 (Verdünnung der Schwefelsäure: 190 ml H_2O und 310 ml konz. H_2SO_4).
- B: Zu 3 ml Phenylhydrazin - Schwefelsäurereagenz kommen 10 Chloroform Extrakt (65 mg Phenylhydrazinhydrochloricum gelöst in 150 ml der obigen Lösung).
- C: Beide Chloroformextrakte werden 1 Minute kräftig geschüttelt. Nach Phasentrennung wird das Chloroform abgelassen und verworfen. Blank (A) bzw. Phenylhydrazin - Schwefelsäure - Reagenz (B) werden in ein Reagenzglas abgelassen und für 60 Minuten bei 60°C im Thermostaten belassen.
- 6) Messung mit dem Beckman - Spektral - Photometer Modell D.U. bei einer Wellenlänge von 410 mμ der Phenylhydrazin - Schwefelsäure - Reagenz (B) gegen den Blindwert (A).
Ermittlung der Hormonmenge mit einer Eichkurve, die mit ansteigenden Cortisolmengen aufgestellt wurde. Die Corticoidwerte in je 1,5 ml Urin rechnet man auf die 24 - Stunden Urinmenge um. Die Eichkurve verläuft linear.

Herstellung der Eichkurve.

Stammlösung:

- a) 10 mg Cortisol gelöst in 100 ml absol. Athylalkohol = (1000 in 1 ml)
b) Herstellung einer Verdünnung der Stammlösung auf eine Konzentration von 10 μ /ml: Aufstellung der Eichkurve mit 0,5 μ bis 50 μ (0,5, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 50 μ). Der Alkohol wird abdestilliert. Trockene Rückstand wird in 3 ml Reagenz - Lösung (Phenylhydrazin - Schwefelsäure - Reagenz) gelöst und im Beckman bei 410 M_m abgelesen (nach Farbentwicklung bei 60°C in 60 Minuten).

Extraktionswerte

0,5 μ	Ext. 0,09
1 μ	" 0,020
3 μ	" 0,060
5 μ	" 0,095
10 μ	" 0,195
20 μ	" 0,390
30 μ	" 0,590
50 μ	" 0,980

Arbeitsverlust:

Die Ermittlung des Arbeitsverlustes erfolgte durch Wiedergewinnungsversuche. Reines Cortisol wurde dem Urin in bekannter Menge zugesetzt und anschließend eine Corticoidbestimmung durchgeführt. Nach Abzug der in einer Leerprobe des Urins enthaltenen veresterten Corticoidmenge resultierte die wiedergefundene Menge an Cortisol.

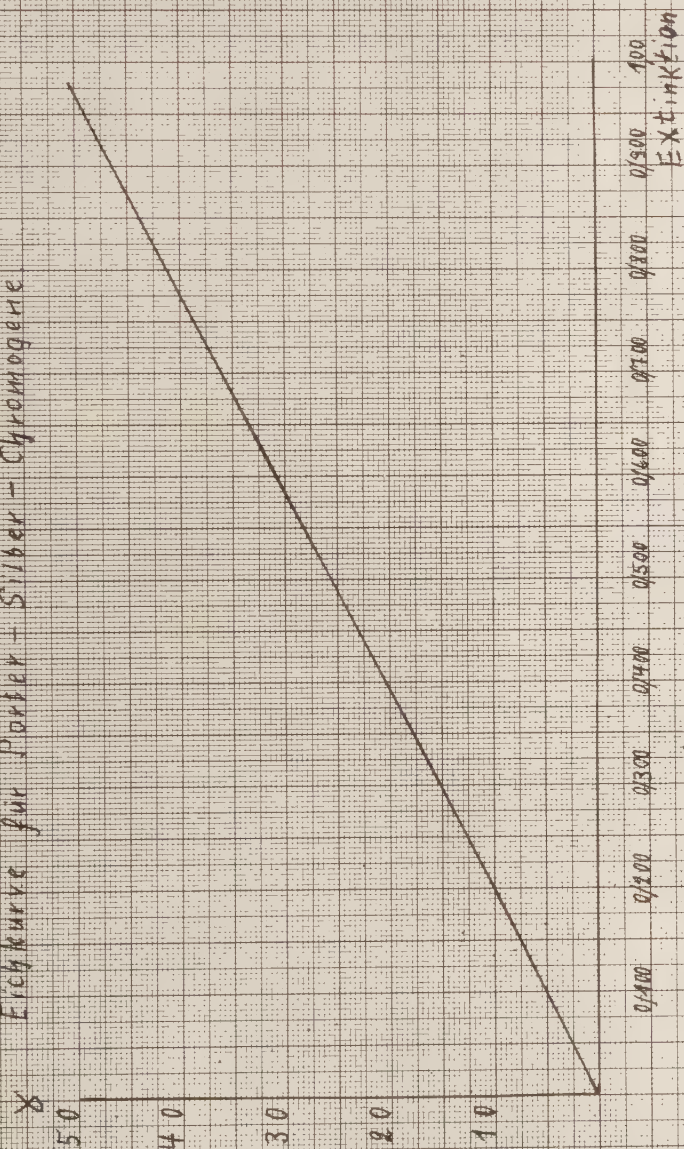
Nach Abzug der Reagenzienleerwerte ergab sich aus 6 Versuchen folgende mittlere Extinktion:

20 μ Cortisollösung	Ext. 0,390
Veresterte Corticoide in 1,5 ml Urin	" 0,116 (Leerprobe)
Extrakt aus 1,5 ml des gleichen Urins nach Zugabe von 20 μ Cortisollösung:	Ext. 0,441

Nach Abzug der Extinktion der Leerprobe betrug die Extinktion der wiedergefundenen Cortisolmenge 0,325, also 83% der Extinktion der zugesetzten Cortisolmenge. Demnach machte der Arbeitsverlust 17% aus, er wurde bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt.

Die Berechnung des Arbeitsverlustes aus dem Verhältnis der Extinktionen ist nur, wie in diesem Fall, bei Linearem Verlauf der Eichkurve.

Eichkurve für Porter - Silber - Chromogene



1. DIE WIRKUNG VON PROGESTRON AUF DIE AUSSCHIEDUNG DER CORTI-COSTEROIDE

Aus den im allgemeinen Teil geschilderten Versuchen von PINCUS (8, 13), SAMUELS (18) und PLOTZ (20) geht hervor, daß Progesteron im Organismus und auch durch überlebendes NNR - Gewebe in Steroide von Typ des Cortisons umgebaut wird. ZANDER (31) konnte feststellen, daß das in der Gelbkörperphase im menschlichen Blut kreisende Progesteron für die prämenstruell erhöhte Corticoidausscheidung bedeutungslos ist.

Er verwandte die quantitative Methode von STAUDINGER und SCHMEISSER (25).

2. EIGENE ERGEBNISSE

Untersucht wurde die Ausscheidung der veresterten Corticoide (Porter - Silber - Chromogene) im Urin nach intramuskulärer Injektion von Progesteron als Kristallsuspension (Lutocyclin-Ciba bzw. Lutren-Hoechst).

Die Ergebnisse sind in den Tabellen I bis VII und in den Diagrammen 1 bis 7 zusammengestellt.

TABELLE I. Frau La. 64 Jahre, Menopause.

Versuchstag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidausschdg. in mg	Präparat
I	930	149	5,674	
II	1170	112,5	5,457	
III	1150	89	5,734	
IV	1600	146	9,638	← Lutocyclin 100 mg i. m.
V	980	106	4,168	
VI	860	141	4,891	

TABELLE II. Frau Mil. 54 Jahre, Menopause.

Versuchstag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidausschdg. Präparat in mg
I	740	116	3,566
II	590	132	3,315
III	860	129	4,594
IV	1070	117	3,324
V	1050	112	4,866
VI	1190	67	3,242

← Lutocyclin
100 mg i. m.

TABELLE III. Frau Koh. 47 Jahre, Menopause.

Versuchstag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidausschdg. Präparat in mg
I	960	103	4,086
II	830	126	4,260
III	760	121	3,784
IV	1040	85	3,591
V	980	85	3,384
VI	1120	95	5,216

← Lutocyclin
100 mg i. m.

TABELLE IV. Frau Sep. 54 Jahre, Menopause.

Versuchstag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidausschdg. Präparat in mg
I	1540	86	5,440
II	1860	70	5,378
III	1540	100	6,308
IV	1060	117	5,124

← Lutocyclin
100 mg i. m.

TABELLE V. Frau Wa. 54 Jahre, Menopause.

Versuchstag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidausschdg. in mg	Präparat
I	1100	115	5,706	
II	1520	55	3,418	
III	1240	75	3,788	← Lutocyclin 100 mg i.m.
IV	1380	98	5,542	
V	880	135	4,875	
VI	1400	89	5,116	

TABELLE VI. Frau Be. 55 Jahre, Menopause.

Versuchstag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidausschdg. in mg	Präparat
I	800	168	5,461	
II	840	186	6,409	
III	1370	181	9,903	← Lutocyclin 100 mg i.m.
IV	1600	120	7,963	
V	1700	134	9,277	
VI	1360	130	7,325	
VII	1280	111	5,132	

TABELLE VII. Frau Fe1. 69 Jahre, Menopause.

Versuchstag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidausschdg. Präparat in mg
I	930	177	6,797
II	960	112	4,395
III	1100	57	2,561
IV	540	152	3,383
V	2090	35	3,021
VI	1260	87	4,435
VII	1240	113	6,772

← Lutocyclin
100 mg i. m.

TABELLE VIII. Frau Hu. 58 Jahre, Menopause.

Versuchstag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidausschdg. Präparat in mg
I	800	125	4,112
II	760	137,5	4,310
III	800	127,5	4,190
IV	740	117,5	3,525
V	1050	109,5	4,680
VI	1080	150	6,679
VII	750	152	4,697
VIII	800	142	4,657
IX	1040	100	4,260

← Lutocyclin
100 mg i. m.

TABELLE IX. Frau Sch. 52 Jahre, Menopause.

Versuchstag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidausschdg. in mg	Präparat
I	700	112	3,260	
II	980	111	4,486	
III	1300	79	4,176	← Lutren 100 mg i.m.
IV	1140	113	5,310	
V	1460	81	4,866	
VI	1450	83	4,891	
VII	1080	99	4,380	
VIII	1040	114	4,842	
IX	850	139	4,841	

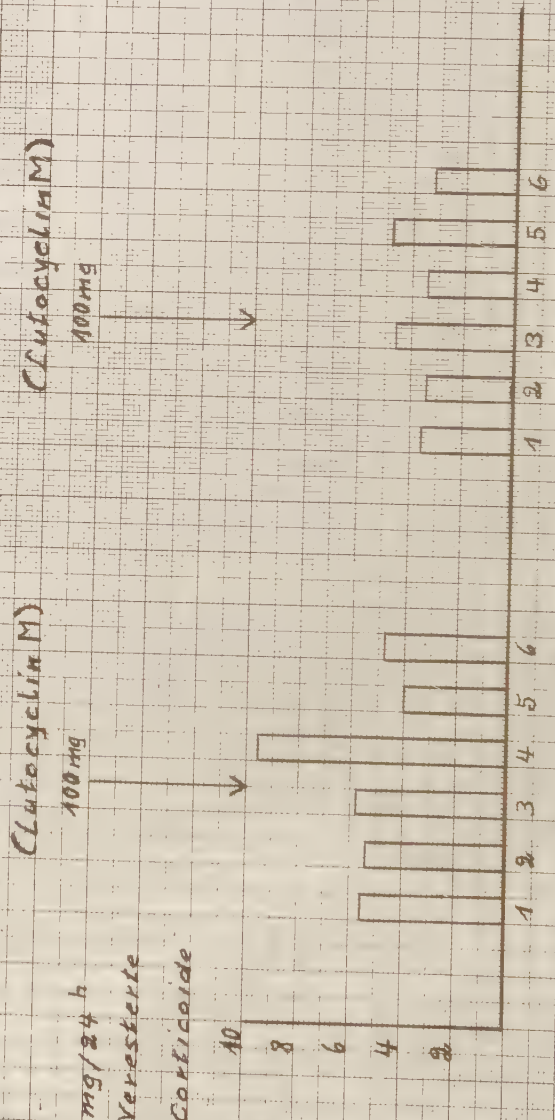
TABELLE X. Die Mittelwerte an veresterten Corticoiden bei 9 Frauen vor und nach der Injektion von Progesteron

Fälle	ante applicat. mg/24 ^h Urin	post applicat. mg/24 ^h Urin
I	5,62 (3)	6,23 (3)
II	3,82 (3)	3,81 (3)
III	4,04 (3)	4,06 (3)
IV	5,40 (2)	5,71 (2)
V	4,30 (3)	5,17 (3)
VI	7,25 (3)	7,42 (4)
VII	4,58 (3)	4,48 (4)
VIII	4,20 (3)	4,74 (6)
IX	3,97 (3)	4,85 (6)
Durchschnitt	4,79 (26)	5,15 (34)

TABELLE XI. Die 24^h Urinnengen vor und nach Injektion von Progesteron

Fälle	ante applicat ml	post applicat. ml
I	1083	1146
II	730	1103
III	850	1046
IV	1133	1300
V	1290	1220
VI	1003	1485
VII	996	1280
VIII	786	910
IX	993	1180
Durchschnitt	984	1185

Die Corticoidausscheidung nach Injektion von Progesteron in Form
 Abb. I einer Progesteron - Kristallsuspension



Frau La., 64 Jahre, Menopause Frau Mil., 54 Jahre, Menopause

Die Corticoidausscheidung nach Injektion von Progesteron

Abb II in Form einer Progesteron - Kristallsuspension

(Lutocystin M) (Lutocystin M)

100 mg

100 mg

100 mg

mg/24 h

Körpertemperatur

Corticoid

10

8

6

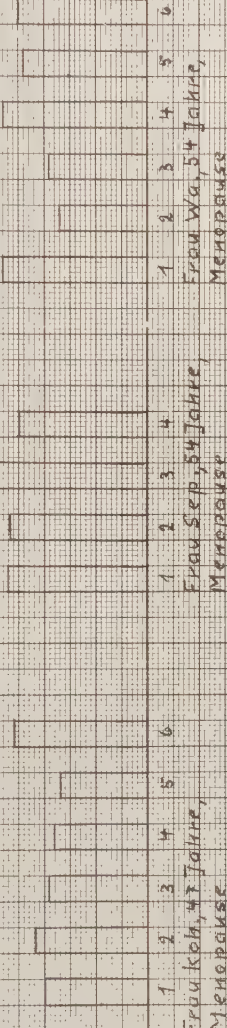
4

2

↓

↓

↓



Die Corticoidausscheidung nach Injektion von Progesteron in Form
Abb III einer Progesteron - Kristallsuspension

(Lutocyclin M)

100 mg

mg/24 h

Veresterte

Corticoid

(Lutocyclin M)

100 mg

↓

↓

10
8
6
4
2

7

1

2

3

4

5

6

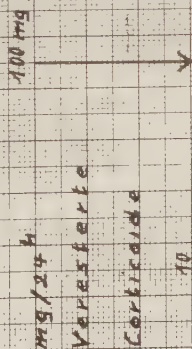
7

Frau Be, 55 Jahre, Menopause

Frau Fe, 69 Jahre, Menopause

Die Corticoidausscheidung nach Injektion von Progesteron inform
Abb. II einer Progesteron - Kristallsuspension

(Glucocortikoid)



Frau III, 58 Jahre, Menopause

(Lutiken)



Frau Sch, 52 Jahre, Menopause

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Injiziert wurden bei 9 Frauen nach der Menopause jeweils einmalig 100 mg Progesteronkristalle in Form von Lutocyclin - Ciba oder Lutren - Hoechst.

Im 1. Fall kam es unmittelbar nach der Injektion zu einer erheblichen Steigerung der Corticoidausscheidung, die aber auf einen einzigen Tag beschränkt blieb. Im 2. Fall zeichnete sich keine ausgesprochene Differenz zwischen den Werten vor und nach der Injektion ab. Dasselbe gilt für den 3. Fall. In Fall 4 zeigte die Corticoidausscheidung wiederum eine einmalige Steigerung kurz nach der Injektion, während in den Fällen 5 - 8 keine eindeutigen Veränderungen nachzuweisen waren. Der Fall 9 weist wiederum eine einmalige Erhöhung nach der Injektion auf.

Betrachtet man die Mittelwerte an veresterten Corticoiden bei den 9 Frauen vor und nach der Injektion von 100 mg Progesteronkristallen, so ergibt sich bei durchschnittlich 3 Ausgangs- und bei durchschnittlich 4 Endwerten folgendes Bild: 3 Frauen (Fall 1, 5 und 9) reagierten auf die Progesteroninjektion mit einer Erhöhung der Corticoidausscheidung, die knapp 1 mg im Durchschnitt pro Tag ausmachte. Bei den anderen 6 Frauen sind die Mittelwerte vor nach der Applikation auffallend gleichmäßig.

Nimmt man den Durchschnitt der Corticoidausscheidung von allen 9 untersuchten Frauen vor und nach der Injektion, so liegt der Durchschnittswert nur um 300 μ g höher als der Durchschnittsausgangswert. Diese geringe Erhöhung ist nicht signifikant. Da dem Progesteron ein diuretischer Effekt zugeschrieben wird, wurden die 24 - Stunden Urinmengen von allen 9 Frauen vor und nach der Progesteronverabreichung zusammengestellt. Es zeigte sich eine vermehrte Urinausscheidung nach der Injektion in 8 von 9 Fällen. Lediglich in Fall 5 war keine Änderung der Ausscheidungsmenge festzustellen.

Der Durchschnittswert von allen 9 Frauen vor der Injektion betrug 984 ccm, und der Durchschnittswert nach Progesteron 1185 ccm. Es handelt sich hierbei um eine Differenz von 200 ccm, die nach den Tafeln von PÄTAU mit $p = 0,008$ signifikant ist.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse von PINCUS und Mitarb. (8, 13) beweisen, daß die isolierte durchströmte Nebenniere (NN) Progesteron in höhedydroxylierte Steroide umwandeln kann. Auch die in vivo Versuche von PLOTZ (20) am Menschen in der Schwangerschaft und beim Mb. Cushing sprechen für einen Umbau von Progesteron in Cortisol und Cortison.

Es bleibt die Frage offen, ob die NNR des Menschen bei normaler endokriner Ausgangssituation diesen Umbau ebenfalls vollzieht und ob er quantitativ von Bedeutung ist.

Die Bestimmung der veresterten Corticoide nach PORTER und SILBER (21) ergab für die gebundenen Corticoide, daß keine signifikante Änderung in der Corticoidausscheidung vor und nach der Injektion von 100 mg Progesteron auftreten. Nur in einzelnen Fällen erfolgte ein kurzfristiger einmaliger Anstieg unmittelbar nach der Injektion, dem aber im Zusammenhang mit den übrigen Ergebnissen keine große Bedeutung beigemessen werden kann.

Die an der isolierten NNR gewonnenen Ergebnisse lassen sich also bei der Frau nach der Menopause nicht ohne weiteres bestätigen. Im Zusammenhang mit den vorliegenden Untersuchungen sind die Ergebnisse von FRIEDBURG (6) aus der 1. Univ.-Frauenklinik München von Bedeutung. Er untersuchte die Ausscheidung der freien Corticoide vor und nach der Verabreichung von Progesteron. Die Mittelwerte nach der Applikation lagen hier in sämtlichen Fällen eindeutig über den Ausgangswerten, wobei eine Signifikanz von $p = 0,004$ (Tafel nach PÄTAU) errechnet wurde. Die Ergebnisse waren besonders am ersten Tag eindeutig. Ein durch die Injektion entstandener Stress konnte ausgeschlossen werden, ebenfalls eine unspezifische Wirkung.

Man kann aus den Ergebnissen von FRIEDBURG (6) und aus den eigenen Versuchen schließen, daß Progesteron in ganz geringem Umfang sofort in freie Corticoide umgewandelt wird, daß die Umwandlungsrate aber relativ niedrig liegt. Bei den gebundenen Corticoiden ist sie jedenfalls so gering, daß sie nicht mehr eindeutig zum Ausdruck kommt.

Für die Therapie mit Progesteron ergibt sich aus diesen Überlegungen, daß mit einer wesentlichen Beeinflussung der Nebennierenrinde nicht zu rechnen ist und daß das zugeführte Progesteron nur in relativ geringem Umfang in freie Corticoide umgewandelt werden kann. Für die Therapie hat diese geringe Umwandlung sicher keine nennenswerte Bedeutung.

ZUSAMMENFASSUNG:

Bei 9 Frauen nach der Menopause wurde die Ausscheidung der veresterten Corticoide nach PORTER und SILBER (21) bestimmt.

Nach durchschnittlich 3 Ausgangswerten erfolgte die Injektion von 100 mg Progesteronkristallen (Lutocyclin M, Lutren). Auf die Injektion erfolgte nur in 3 Fällen unmittelbar ein geringer Anstieg der gebundenen Corticoide im Harn. Die übrigen Werte entsprachen mehr oder weniger denen vor der Applikation von Progesteron.

Vergleicht man das Ergebnis dieser Untersuchungen mit denen der Arbeit von FRIEDBURG (6) der die freien Corticoide nach Progesteron untersucht hat, so ergibt sich eine Diskrepanz zwischen dem Verhalten von freien und gebundenen Corticoiden im Harn. Während bei den veresterten Corticoiden, wie gezeigt, eine deutliche Zunahme entfällt, zeigen die freien Corticoide einen signifikanten Anstieg. Aus diesen Untersuchungen kann man schließen, daß nach der Injektion von Progesteron nur ein kleiner Teil des Progesteron in freie Corticoide umgewandelt wird und daß später eine Veresterung nicht mehr oder höchstens in geringem Umfange erfolgen kann.

Signifikant verhielt sich dagegen die Harnausscheidung. Es bestätigte sich wiederum der diuretische Effekt des Progesterons. Der Mittelwert vor und nach der Injektion von 100 mg Progesteron lag bei den Endwerten um 200 ccm höher als bei den Anfangswerten. Die günstige Wirkung des Progesterons beim Prämenstruellen Syndrom kann damit teilweise durch eine Entwässerung erklärt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BARRY, M. L., EIDINOFF, K., DOBRINGER, T. F., GALLAGHER:
Endocrinology 50, 587 (1952)
2. BLOCH, K.: J. of Biol. Chem. 157, 661 (1945)
3. BURTON, R. B., E. H. KEUTMANN, C. WATERHOUSE, E. A. SCHULER:
J. of Clin. Endocrin. a. Metabol. 13, 48 (1953)
4. COPE, C. L., E. G. BLACK:
Clin. Science 17, 147 (1958)
5. DORFMAN, R. J.: Ciba Foundation Colloquia on Endocrin. Bd. II, 291
(London 1952)
6. FRIEDBURG, D.: Dissertation aus der 1. Fr.-Klinik München (1961)
7. HELLMANN, L., H. L. BRADLOW, I. ADESMAN, D. K. FUKUSCHIMA,
J. L. KULP, T. F. GALLAGHER:
J. Clin. Invest. 33, 1106 (1954)
8. JACOBSEN, R. P., G. PINCUS:
Amer. J. Med. 10, 531 (1951)
9. KAISER, R.: Klin. Wschr. 32, 495 (1954)
10. KAISER, R.: Klin. Wschr. 33, 15 (1955)
11. KARL, H. J.: Klin. Wschr. 1124 (1959)
12. KAUFMANN, C., J. ZANDER:
Klin. Wschr. 34, 7 (1956)
13. LEVY, JEANLOZ, HECHTER, SCHENKER, PINCUS:
J. of Biol. Chem. 211, 867 (1954)
14. LONG, C. N. H.: Rec. Progr. in Hormon. Res. 7, 75 (1952)
15. PFEFFER, K. H., W. RUPPEL, H. J. STAUDINGER, L. WIESSBECKER:
Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 214, 165 (1952)
16. PFEFFER, K. H., H. J. STAUDINGER:
Klin. Wschr. 29, 201 (1951)
17. PFEFFER, K. H., H. J. STAUDINGER:
Angew. Chemie 63, 321 (1951)
18. PLAGER, J. E., L. T. SAMUELS:
J. of Biol. Chem. 211, 21 (1954)

19. PLOTZ, J.: Mitteilung auf dem Endokrin.-Kongreß Kiel 1959
20. PLOTZ, J.: Geburtsh. u. Frauenhk. 17, 595 (1957)
21. PORTER, C.C., R.H. SILBER:
J. of Biol. Chem. 185, 201 (1950)
22. SAYERS, G., M.A. SAYERS:
Rec. Progr. in Hormon Res. 2, 81 (1948)
23. SELYE, H.: Einführung in die Lehre von Adaptationsyndrom
(Thieme-Verlag 1953)
24. SCHNEIDER, J.J.:
J. of Biol. Chem. 183, 365 (1950)
25. STAUDINGER, H.J., M. SCHMEISSER:
Biochem. Zschr. 321, 83 (1950)
26. STUHLFAUTH, K., R. PROSIEGEL, A. ENGELHARDT - GÖLKEL:
Klin. Wschr. 32, 676 (1954)
27. VERZAR, F.: Schweiz. Med. Wschr. 80, 468 (1950)
28. WETTSTEIN, A.: Mitteilung auf dem IV intern. Kongreß f. Biochemie
Wien 1958
29. WETTSTEIN, A., G. ANNER:
Experientia 10, 397 (1954)
30. WIEST: in ZANDER, J.:
Gebh. u. Frauenhk. 17, 876 (1957)
31. ZANDER, J.: Klin. Wschr. 31, 504 (1953)
32. ZANDER, J.: Gebh. u. Frauenhk. 17, 876 (1957)
33. ZIMMERMANN, W.:
Arzneimittelforsch. 1, 396 (1951)
34. ZIMMERMANN, W.:
Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in
Körperflüssigkeiten. Springer - Verlag 1955.
35. ZIMMERMANN, W.:
Hoppe Seylers Zeitschr. für Phys. Chemie 233, 257 (1935)

Herrn Professor Dr. W. BICKENBACH danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik die Untersuchungen durchzuführen.

Weiterhin möchte ich Herrn Privatdozent Dr. R. KAISER für die Überlassung des Themas und die freundliche Anleitung bei der Durchführung der Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen.

Nicht zuletzt danke ich auch Fräulein Rokowski für die freundliche Anleitung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

L E B E N S L A U F

Am 28.10.1936 wurde ich als Sohn des Abdul-Hossein Mahdavian und seiner Frau Afagh in Meched-Iran geboren.

Nach Volks- und Oberschuljahren kam ich 1957 nach München.

Während der vorklinischen Semester studierte ich in München, legte im Winter 1960 die ärztliche Vorprüfung ab.

Die Klinischen Semester studierte ich weiter in München und beendete mein Studium mit der ärztlichen Prüfung im Wintersemester 1964.

